



# Estrés oxidativo en espermatozoides epididimarios de alpaca criopreservados con diferentes concentraciones de plasma seminal

Jhoana S. Jimenez Carpio<sup>1\*</sup> ; Alejandra Ugarelli Galarza<sup>1</sup> ; Shirley S. Evangelista Vargas<sup>1</sup> .

<sup>1</sup>Universidad Científica del Sur, Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Laboratorio de Biotecnología Reproductiva y Celular, Carretera Panamericana Sur km 19, Villa El Salvador. Lima, Perú.

\*Correspondencia: [jimenez.jhoana@hotmail.com](mailto:jimenez.jhoana@hotmail.com)

Recibido: Julio 2023; Aceptado: Diciembre 2023; Publicado: Enero 2024.

## RESUMEN

**Objetivo.** Evaluar el estrés oxidativo en el espermatozoide epididimario de alpaca criopreservado con diferentes concentraciones de plasma seminal. **Materiales y métodos.** Se emplearon 29 epidídimos de alpaca obtenidos post mortem. Los espermatozoides epididimarios fueron recuperados mediante cortes en un dilutor a base de leche descremada, yema de huevo, fructosa y dimetilacetamina. A continuación, se procedió a separar las muestras en cuatro alícuotas y se agregó plasma seminal (v/v) en diferentes concentraciones (0, 10, 25 y 50%). Luego se evaluó la motilidad espermática y se congelaron mediante una congeladora automática. Al descongelamiento se evaluó motilidad progresiva, potencial de membrana mitocondrial, viabilidad espermática, peroxidación de lípidos y apoptosis espermática mediante citometría de flujo con imágenes. **Resultados.** Los espermatozoides expuestos a 50% de plasma seminal mostraron la motilidad post descongelamiento estadísticamente más baja ( $3.5 \pm 3.7\%$ ) y el porcentaje de células apoptóticas estadísticamente más alto ( $71.43 \pm 20.6\%$ ). En todas las demás variables, no se hallaron diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ). **Conclusiones.** Se obtiene evidencia no concluyente de que la presencia del plasma seminal no afecta la viabilidad, la actividad mitocondrial, ni la peroxidación lipídica de los espermatozoides epididimarios de alpaca durante el proceso de criopreservación; sin embargo, en ausencia de este o cuando es agregado hasta en un 25% en el proceso de criopreservación, es posible obtener mejores resultados en cuanto a motilidad espermática y apoptosis espermática.

**Palabras clave:** Plasma seminal; alpaca; estrés oxidativo; espermatozoide; criopreservación (*Fuente: CAB*).

## ABSTRACT

**Objective.** To assess the oxidative stress on alpaca epididymal sperm frozen with different concentration of seminal plasma. **Materials and methods.** 29 post mortem alpaca epididymis were used. Epididymal sperm were obtained through cuts and suspended in a diluent based on skim milk, egg yolk and fructose and dimethylacetamine. Samples were separated into four aliquots which were

### Como citar (Vancouver).

Jimenez-Carpio JS, Ugarelli-Galarza A, Evangelista-Vargas SS. Estrés oxidativo en espermatozoides epididimarios de alpaca criopreservados con diferentes concentraciones de plasma seminal. Rev MVZ Córdoba. 2024; 29(1):e2833. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2833>



©El (los) autor (es) 2024. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

supplied with seminal plasma (v/v) in concentrations of 0, 10, 25 and 50% respectively; then, sperm motility was assessed before freezing; then, motility was assessed before freezing with an automatic freezer machine. After thawing, mitochondrial membrane activity, sperm viability, lipid peroxidation and sperm apoptosis were assessed using flow cytometry with images. **Results.** Sperm exposed to 50% seminal plasma showed the lowest post-thaw motility ( $3.5\pm 3.7\%$ ) and the highest percentages of apoptotic cells ( $71.43\pm 20.6\%$ ). No significant differences were found in the rest of parameters. **Conclusions.** This study constitutes non-conclusive evidence that presence of seminal plasma does not affect viability, mitochondrial activity, or lipid peroxidation of alpaca epididymal sperm during cryopreservation processes; however, when it is absent or added up to 25% in the cryopreservation process, it may be possible to obtain better results in terms of sperm motility and sperm apoptosis.

**Keywords:** Seminal plasma; alpacas; oxidative stress; spermatozoa; cryopreservation (*Source: CAB*).

## INTRODUCCIÓN

La viscosidad del plasma seminal (PS) de alpaca dificulta el manejo de los eyaculados y la interacción de los espermatozoides con los crioprotectores, lo cual hace necesaria su licuefacción (1). Sin embargo, esto no excluye que el plasma seminal sea un medio protector para los espermatozoides (2), sobre todo durante procesos ajenos a su fisiología normal, como lo es el congelamiento, el cual involucra eventos de estrés térmico, osmótico y oxidativo.

El estrés oxidativo ocurre por un incremento desmedido de las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), generadas de la reducción incompleta de oxígeno durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial (3). Los espermatozoides son particularmente susceptibles a ellos debido a gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de su membrana (4) y su insuficiente cantidad de enzimas antioxidantes intracelulares(5).

Las ROS provocan el reordenamiento de los fosfolípidos de membrana y alteran el flujo de iones en los espermatozoides, lo cual es necesario en procesos fisiológicos normales como el incremento de la motilidad (3), la capacitación espermática y la reacción acrosomal (4). Por el contrario, su excesiva producción está asociada a una reducción de la motilidad espermática (6); activación de la vía de apoptosis (7); fragmentación de ADN, disfunción mitocondrial e infertilidad (5).

En alpacas, durante la criopreservación de espermatozoides, se observa un aumento de las ROS (8), lo que induce una disminución de la motilidad, de la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, de la actividad mitocondrial, de la viabilidad y un aumento en la fragmentación de ADN (9,10,11,12). Se ha

reportado que concentraciones de PS al 10% en espermatozoides epididimarios de alpaca, logran mantener la motilidad e integridad acrosomal y reducen el porcentaje de espermatozoides muertos (12). Igualmente, en espermatozoides de alpaca obtenidos de conductos deferentes se ha reportado que cuando el PS es agregado en concentraciones similares de 10%, mejora la motilidad, la funcionalidad de membrana y la morfología espermática (13). Por otro lado, en llamas, se observó que la presencia de PS modifica el patrón de movimiento de los espermatozoides y su ausencia produce la reacción acrosomal espontánea de los mismos (14); además, en concentraciones de 10 y 50% no es capaz de protegerlos frente al daño producido por la criopreservación (15); y cuando es agregado después del descongelamiento, tampoco es capaz de mejorar la supervivencia espermática de los mismos (16).

A la fecha no existen protocolos para el congelamiento de espermatozoides de alpaca, que permitan mantener parámetros de calidad espermática adecuados para lograr tasas de preñez satisfactorias o similares a las obtenidas con semen fresco (17). Además, aún no se tiene claro el rol que cumple el de PS en la prevención del estrés oxidativo producido durante el congelamiento de espermatozoides de alpaca. Por tal motivo, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de diferentes concentraciones de PS sobre el estrés oxidativo en espermatozoides de epididimo de alpaca criopreservados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

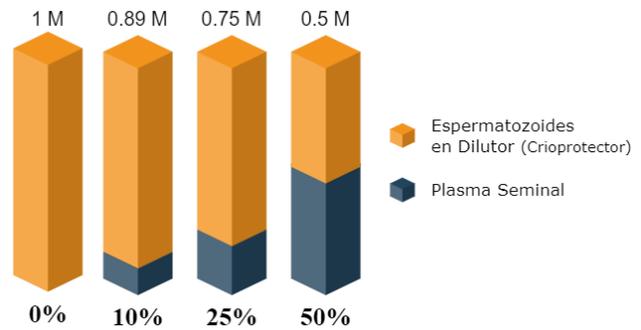
**Manejo del material biológico.** El PS se obtuvo a partir de semen colectado con vagina artificial de 3 animales adultos con fertilidad probada. La viscosidad se eliminó mecánicamente con

las aspiración repetida del semen a través de una aguja (25 G x 5/8") con una jeringa (3 ml) que fueron renovadas con cada muestra individual. En seguida se transfirió a un microvial y se centrifugó 2 veces a 600 G por 8 min para eliminar espermatozoides e impurezas. Al finalizar, se verificó mediante microscopía óptica que el sobrenadante en cada muestra individual no presentara espermatozoides y se almacenó en nitrógeno líquido (-196°C) hasta su uso.

Los espermatozoides se obtuvieron de 29 testículos de alpacas post mortem, provenientes de animales de descarte de raza Huacaya de entre 2 a 6 años de edad beneficiado en el matadero municipal de Huancavelica, Perú; los cuales fueron transportados dentro del saco escrotal en bolsas individuales con Cloruro de Sodio (NaCl) al 0.9% a 5°C (18). El tiempo promedio transcurrido entre el momento del beneficio del animal y la recuperación de espermatozoides epididimarios en el laboratorio, fue de 20 horas aproximadamente. En el laboratorio, los epidídimos fueron aislados y lavados individualmente con NaCl al 0.9% a 37°C. En seguida, cada cola de epidídimo fue ubicado en una placa petri temperada, con 1 ml de dilutor; donde se le realizaron cortes seriados seguidos para la recuperación de los espermatozoides. El dilutor empleado fue a base de leche descremada (18.96 ml), yema de huevo (1 ml), fructuosa (0.960 g) y dimetilacetamida (40 µL).

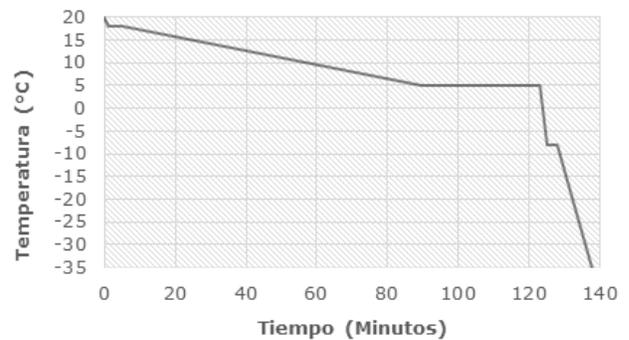
La calidad de la muestra se determinó en base a la motilidad espermática progresiva (%) y la concentración espermática ( $\times 10^6$  espermatozoides/mL). La motilidad se evaluó de forma subjetiva y fue realizada por una única persona, para ello se tomaron 10 µl de muestra y se observaron 5 campos de la misma utilizando un microscopio óptico de luz clara (Eclipse E-100, Nikon, Japón) a 40x. Para la concentración espermática se diluyó una alícuota de 10µL de muestra en 190µl de agua, de donde se transfirieron 2 alícuotas de 10µL a una cámara de Neubauer a 40x; y se observaron 5 cuadrantes (extremos y centro) que posteriormente se promediaron.

Cada muestra fue dividida en 4 alícuotas que fueron suplementadas con PS, previamente descongelado y temperado (37°C), en diferentes concentraciones (v/v): 0%, 10%, 25% y 50%, lo que resultó en diferentes concentraciones finales de crioprotector; como se muestra en la figura 1. Al finalizar, los tratamientos se congelaron en pajillas de 0.25 ml en nitrógeno líquido.



**Figura 1.** Esquema de molaridades del crioprotector contenido en cada tratamiento de plasma seminal del estudio. *Elaboración propia.*

**Criopreservación de espermatozoides.** El congelamiento se realizó con el sistema de criopreservación Freeze Control® (CryoLogic, Australia), programa 7, cuya curva de enfriamiento inicia a los 20°C y desciende gradualmente por 90 min hasta llegar a los 5°C, en donde ocurre el periodo de estabilización por 30 min; a los 120 min continúa el descenso rápido de temperatura, hasta llegar a los -35°C a los 140 min, en donde finaliza (Figura 2). Inmediatamente después, las pajillas se transfirieron directamente al tanque de nitrógeno líquido.



**Figura 2.** Curva de enfriamiento para el Programa 7 en el sistema de criopreservación Freeze Control.

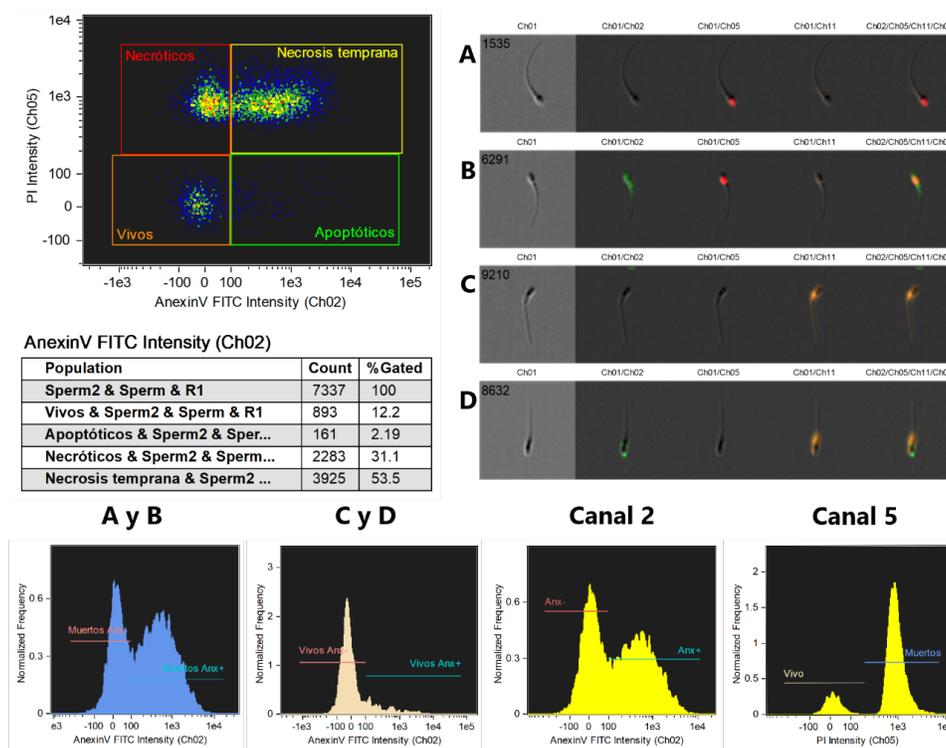
Las muestras se descongelaron en baño maría a 37°C por 1 min y se evaluó la motilidad post descongelamiento (%) de la misma forma antes mencionada. Para retirar el dilutor de la muestra se realizaron 2 lavados: en el primero se agregó Buffer fosfato salino (PBS) a 37°C y se centrifugó a 600 G por 8 min; en el segundo lavado, el pellet se resuspendió en PBS nuevamente y se separó en 2 alícuotas iguales que se centrifugaron por última vez en microviales independientes. Una alícuota sirvió para evaluar viabilidad y apoptosis

espermática; y la otra, para peroxidación lipídica y actividad mitocondrial, ambas mediante citometría de flujo. Para la adquisición de datos, se utilizó un citómetro de flujo con analizador de imágenes (FlowSight, Amnis 2012, USA) y el software INSPIRE® versión 100.2.1955 (Seattle, EEUU) tomando 10000 eventos por cada muestra. Finalmente, el análisis de datos se realizó con el software IDEAS® versión 5.0 (Seattle, EEUU) a través de gráficos de puntos e histogramas. Los histogramas representaron la presencia o ausencia de una sola sonda; mientras que los gráficos de puntos, representaron el cruce de 2 canales, es decir, 2 sondas fluorescentes.

**Evaluación de la viabilidad espermática (VE) y apoptosis espermática (AE).** La evaluación de estos dos parámetros se realizó en forma conjunta. Para ello, se empleó Ioduro de Propidio (P4864, Sigma Aldrich) para evaluar viabilidad; mientras que, el kit FITC Annexin V/Dead Cell

Apoptosis Kit (V13242, Molecular Probes) se empleó para evaluar apoptosis espermática.

Después del segundo lavado post descongelamiento, la sonda FITC Annexin-V (ANX) se utilizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, el pellet se resuspendió en 100µL de Buffer del kit, con 5µL de FITC Annexin-V (Componente A) y se incubó por 15 min a temperatura de ambiente. Inmediatamente se agregó 0.5 µL de solución de trabajo de Ioduro de propidio (IP) (concentración final de 5 µg/mL) y se incubó por 10 min en oscuridad. Al finalizar, se agregó 400µL de Buffer y se conservó en baño de hielo a 4°C (HC110-Pro Digital Thermal Dry-Bath, Scilogex, USA) hasta la adquisición. Tanto IP como ANX fueron excitadas con un láser de longitud de onda 488 nm, a una potencia de 30 mW y se detectaron en los canales 2 (560 – 595nm) y 5 (642 – 740nm) respectivamente (Figura 3).

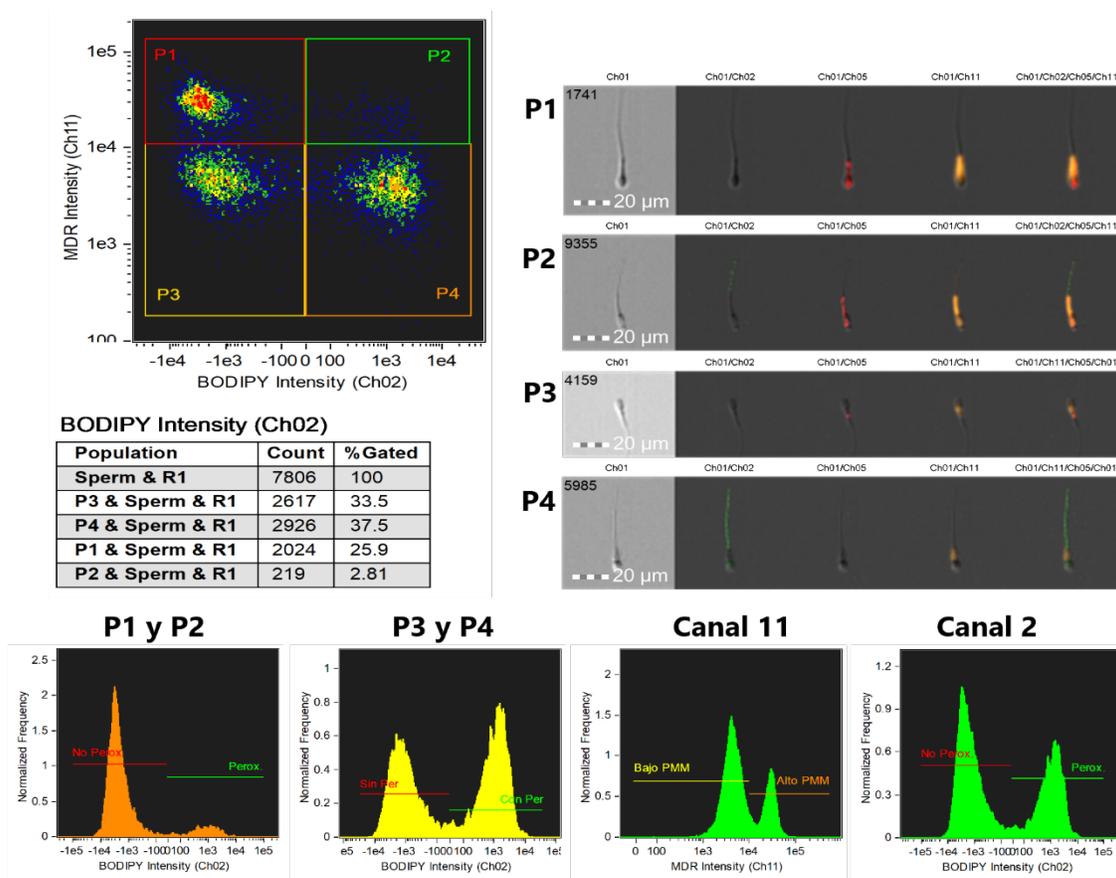


**Figura 3.** Gráfico de puntos correspondiente a Ioduro de Propidio (Canal 5) versus FITC Annexin V (Canal 2) para el análisis de viabilidad espermática y apoptosis espermática mediante citometría de flujo con imágenes, en espermatozoides epididimarios de alpaca, con sus respectivos histogramas según canal de detección. A) Espermatozoides necróticos marcados con FITC AnnexinV, pero no PI, B) Espermatozoides con necrosis temprana marcados con FITC AnnexinV y PI, C) Espermatozoides vivos, no fluorescentes; y D) Espermatozoides Apoptóticos, marcados con AnnexinV pero no PI. *Elaboración propia.*

**Evaluación de la actividad mitocondrial (AM) y peroxidación lipídica de membrana (PL).** La evaluación de estos dos parámetros también se realizó de forma conjunta. Se utilizó MitoTracker Deep Red 633 (M22426, Molecular Probes) para medir el potencial de membrana mitocondrial (PMM) en conjunto con C11 BODIPY 581/591 (D3861, Molecular Probes) para detectar la presencia de procesos de oxidación lipídica.

Se agregó 1µL de solución stock (200µM) de BODIPY (BP) en 100µL de muestra, para llegar a una concentración final de 2µM y se incubó a 37°C por 30 min. Para el control positivo, antes de utilizar BP se agregó 10µL de sulfato ferroso

(215422, Sigma Aldrich) a 800µM a la muestra de 100µL, (concentración final de 80µM); y se incubó a 37°C por 60 min. Finalmente, se agregó 0.5µL de solución de trabajo de MitoTracker Deep Red 633 (MDR) (diluida previamente con Dimetilsulfoxido para llegar a una concentración final de 100nM); y se incubó por 10 min a 38°C en oscuridad. MDR fue excitada con un láser de 642 nm a una potencia de 15 mW, que se detectó en el canal 11 (642 – 740nm). Por otro lado, BP fue excitada con un láser de 488 nm a una potencia de 30 mW y se detectó en dos canales: 5 (642 – 740nm) para la sonda intacta (rojo); y 2 (560 – 595nm) para la sonda oxidada (verde) (Figura 4).



**Figura 4.** Gráfico de puntos correspondiente a Mitotracker Deep Red (Canal 11) versus C11- BODIPY (Canal 2) para el análisis de potencial de membrana mitocondrial y peroxidación lipídica por citometría de flujo con imágenes en espermatozoides epididimarios de alpaca, con sus respectivos histogramas según canal de detección: P1) Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial sin peroxidación (MDR+ /BP-), P2) Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial con peroxidación (MDR+ /BP+), P3) Espermatozoides con bajo potencial de membrana mitocondrial, sin peroxidación (MDR- /BP-); y P4) Espermatozoides con bajo potencial de membrana mitocondrial, con peroxidación (MDR- /BP+). *Elaboración propia.*

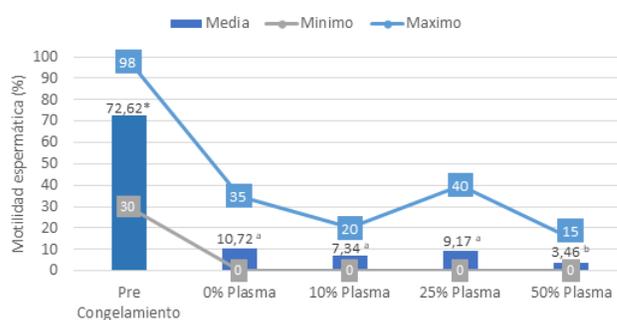
Para el análisis del potencial de membrana mitocondrial (PMM) evaluada con BP en el canal 11, se tomó en cuenta 2 poblaciones claramente definidas en cada histograma. Para ello, se definió como espermatozoides con alto PMM a aquel pico de espermatozoides con una alta fluorescencia de color naranja; y, aquellos espermatozoides con bajo PMM, a aquel pico que representó aquellos espermatozoides con una baja fluorescencia naranja (Figura 4, canal 11).

**Análisis estadístico.** El estudio se realizó con el software Stata/SE Versión 16.1 (StataCorp LLC, Texas, USA). Para determinar el efecto de la concentración de PS sobre el estrés oxidativo en los espermatozoides epididimarios de alpaca post congelamiento, se evaluaron espermatozoides epididimarios resuspendidos en un dilutor con crioprotector, con 4 concentraciones de PS distintas. Las variables evaluadas cuantitativas continuas (en unidad de porcentaje), fueron: motilidad progresiva (antes y después del congelamiento); viabilidad espermática, actividad mitocondrial, peroxidación lipídica y apoptosis espermática post descongelamiento. Para determinar si las poblaciones presentaban una distribución normal ( $p > 0.05$ ), se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Ninguno de los grupos presentó una distribución normal, por lo que se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0.05$ ) para determinar la diferencia estadística entre las medianas de los tratamientos.

## RESULTADOS

Los espermatozoides de alpaca recuperados de epidídimo tuvieron una concentración espermática media de  $144 \times 10^6$  espermatozoides/ml (rango:  $8-418 \times 10^6$  espermatozoides/ml); con una motilidad espermática previa al congelamiento de tipo progresiva, alcanzando un promedio de  $72.6 \pm 17.2\%$  (Figura 5).

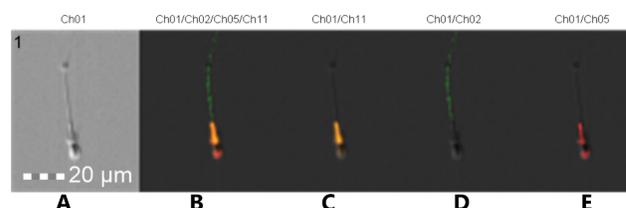
La motilidad espermática post descongelamiento (media  $\pm$  DE) en todos los grupos fue menor a 10%. El grupo 50%PS obtuvo la motilidad post descongelamiento estadísticamente más baja ( $3.5 \pm 3.7\%$ ); mientras que, entre las concentraciones de 0, 10 y 25%, no hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), resultando ser  $10.7 \pm 9.4\%$ ;  $7.3 \pm 5.7\%$  y  $9.2 \pm 10.4\%$  respectivamente (Figura 5).



<sup>a,b</sup> Superíndices diferentes dentro del mismo color distintivo (variable) indican diferencia significativas entre grupos experimentales ( $p \leq 0.05$ ). Los valores son promedios porcentuales. \*El valor correspondiente a la motilidad pre-congelamiento no se incluyó en la estadística.

**Figura 5.** Motilidad progresiva de espermatozoides epididimarios de alpaca antes y después del congelamiento con 4 concentraciones distintas de plasma seminal.

El citómetro de flujo que se utilizó en este estudio tenía incorporado un analizador de imágenes, el cual hizo posible la verificación visual de cada espermatozoide en cada población según el canal y sonda fluorescente utilizada, tanto en la adquisición de datos como en su análisis posterior (Figura 6).



**Figura 6.** Evaluación de la actividad mitocondrial (AM) y peroxidación lipídica de membrana (PL) en un espermatozoide epididimario de alpaca post descongelamiento (A) con alto potencial de membrana mitocondrial y peroxidación lipídica en su membrana (B); marcado con la sonda Mitotracker Deep Red (C) y la sonda BODIPY intacta (D) y oxidada (E). Escala de barra: 20  $\mu$ m aplicable a todas las imágenes. Elaboración propia.

Dicha herramienta permitió establecer de forma más precisa los límites de cada grupo de espermatozoides en la muestra. En el caso de los histogramas, permitió establecer dos poblaciones muy bien definidas; mientras que, en los gráficos de puntos, hicieron posible establecer cada cuadrante correctamente; tanto para el estudio de apoptosis espermática, como

de peroxidación lipídica, tal cual se expone en las muestras representativas de las figura 3 y figura 4, respectivamente. Asimismo, cabe resaltar que los resultados de la tabla 1 provienen del análisis únicamente de histogramas de cada sonda; mientras que, la tabla 2 y la figura 7 se han formulado en base a los resultados provenientes de gráficos de puntos (Figura 3 y Figura 4).

Los parámetros generales obtenidos en cuanto a motilidad progresiva, viabilidad espermática, potencial de membrana mitocondrial y daño oxidativo post descongelamiento en los espermatozoides epididimarios de alpaca según la suplementación de 0, 10, 25 y 50% de plasma seminal, se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Parámetros seminales post descongelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca sometidos a 4 concentraciones distintas de plasma seminal.

Parámetros	PS			
	0%	10%	25%	50%
<b>Viabilidad Espermática (VE)</b>				
Espermatozoides vivos	12.1 <sup>a</sup>	14.3 <sup>a</sup>	14.6 <sup>a</sup>	16.5 <sup>a</sup>
Espermatozoides Muertos	87.1 <sup>a</sup>	85.7 <sup>a</sup>	85.3 <sup>a</sup>	83.5 <sup>a</sup>
<b>Actividad Mitocondrial (AM)</b>				
Alto potencial de membrana mitocondrial (APMM)	20.9 <sup>a</sup>	19.6 <sup>a</sup>	18.3 <sup>a</sup>	16.9 <sup>a</sup>
Bajo potencial de membrana mitocondrial (BPMM)	78.9 <sup>a</sup>	80.3 <sup>a</sup>	81.6 <sup>a</sup>	82.9 <sup>a</sup>
<b>Daño Oxidativo</b>				
Motilidad progresiva	10.7 <sup>a</sup>	7.3 <sup>a</sup>	9.2 <sup>a</sup>	3.5 <sup>b</sup>
Peroxidación lipídica (PL)	74.4 <sup>a</sup>	74.7 <sup>a</sup>	75.6 <sup>a</sup>	71.7 <sup>a</sup>
Apoptosis espermática (AE)	48.5 <sup>a</sup>	51.7 <sup>ab</sup>	60.1 <sup>b</sup>	71.4 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Superíndices diferentes dentro del mismo color distintivo (variable) indican diferencias significativas entre grupos experimentales ( $p \leq 0.05$ ). Los valores son promedios porcentuales.

Respecto a la VE, el porcentaje de espermatozoides vivos post descongelamiento fue considerablemente bajo en todos los grupos experimentales; siendo ligeramente mayor en el grupo 50%PS, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) (Tabla 1). Por otro lado, en el porcentaje de espermatozoides con alto PMM se puede apreciar una ligera disminución a medida que aumenta la concentración de PS, sin hallarse diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Tabla 1).

Los niveles de AE fueron estadísticamente distintos entre los grupos ( $p \leq 0.05$ ), obteniéndose los mejores resultados para el grupo 0%PS (Tabla 1). Cabe resaltar que la distribución de AE entre las poblaciones de espermatozoides vivos y muertos fue distinta entre los grupos. Es así que, la población de espermatozoides con necrosis temprana fue menor que la población de espermatozoides necróticos en el grupo 0%PS; mientras que, en los demás grupos esta diferencia se invierte (Tabla 2).

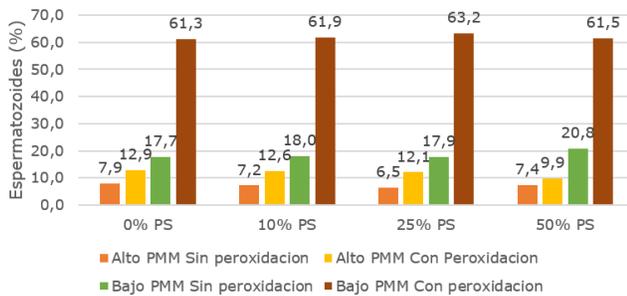
La diferencia entre las poblaciones de espermatozoides con necrosis temprana y espermatozoides necróticos es considerablemente mayor en el grupo 50%PS y va disminuyendo conforme se reduce la concentración de PS.

**Tabla 2.** Distribución de apoptosis espermática post descongelamiento en espermatozoides epididimarios de alpaca sometidos a 4 concentraciones distintas de plasma seminal.

	PS			
	0%	10%	25%	50%
Vivos	7.9 <sup>a</sup>	8.5 <sup>a</sup>	8.4 <sup>a</sup>	7.8 <sup>a</sup>
Apoptóticos	4.8 <sup>a</sup>	5.6 <sup>a</sup>	6.1 <sup>a</sup>	8.5 <sup>a</sup>
Necrosis temprana	41.8 <sup>a</sup>	44.1 <sup>ab</sup>	52.5 <sup>bc</sup>	61.6 <sup>c</sup>
Necróticos	44.4 <sup>a</sup>	40.8 <sup>ab</sup>	32.1 <sup>b</sup>	21.3 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Superíndices diferentes dentro del mismo color distintivo (variable) indican diferencias significativas entre grupos experimentales ( $p \leq 0.05$ ). Los valores son promedios porcentuales.

Los niveles de PL en los cuatro grupos experimentales fueron similares entre sí, mayores a 70%. Asimismo, aunque no se halló diferencia estadística entre los grupos, nuevamente se pudo apreciar una ligera disminución para 50%PS, en comparación con los demás grupos (Tabla 1). A pesar de ello, la distribución de los niveles de PL entre poblaciones de espermatozoides con alto y bajo PMM fue muy similar entre los grupos, siendo la proporción de PL siempre mayor tanto en el grupo de espermatozoides con alto como bajo PMM (Figura 7).



No existe diferencias significativas entre grupos experimentales ( $p \leq 0.05$ ). Los valores son promedios porcentuales.

**Figura 7.** Distribución de peroxidación lipídica de membrana plasmática y potencial de membrana mitocondrial post descongelamiento, en espermatozoides epididimarios de alpaca sometidos a 4 concentraciones distintas de plasma seminal (0, 10, 25 Y 50% PS).

## DISCUSION

El presente estudio investigó el efecto de 4 concentraciones de plasma seminal en el congelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca con el fin de (I) identificar el daño oxidativo que puede darse sobre las células y (II) proponer la concentración de plasma seminal más adecuada para el congelamiento de espermatozoides de alpaca, que resulten con menores efectos deletéreos en cuanto al daño oxidativo.

En esta investigación se optó por utilizar espermatozoides recuperados de epidídimo porque, además de ser un modelo experimental factible (19), también tienen la condición de no haber sido previamente expuestos a los componentes del PS, lo cual resulta necesario y pertinente para efectos del presente estudio.

La motilidad inicial en el presente estudio fue considerablemente más alta en comparación a las obtenidas por otros autores utilizando espermatozoides epididimarios de alpaca, quienes obtuvieron motilidades de  $36.8 \pm 12.8\%$  y  $69.7 \pm 12.1\%$  (20,21). Esto podría deberse al dilutor utilizado en ambos estudios (Tris) el cual no contenía proteínas de la leche y lipoproteínas de baja densidad (LDL), que se han demostrado protegen a los espermatozoides del choque térmico y mejoran la motilidad espermática entre otros parámetros (19). Por otro lado, aunque otros autores utilizaron el mismo dilutor (a base de leche descremada, yema de huevo y fructuosa) también reportaron motilidades menores ( $46.1 \pm 7.7\%$ ;  $46.1 \pm 7.7\%$  y  $62.5 \pm 19.4\%$ ) (10,11,22), lo cual podría deberse a que existen diferencias en los

parámetros espermáticos entre individuos y dentro de ellos. (23).

La motilidad post descongelamiento (media $\pm$ DE) del tratamiento 50%PS ( $3.46 \pm 3.7\%$ ), fue significativamente menor en comparación a los demás, que fueron estadísticamente iguales entre ellos ( $10.7 \pm 9.4\%$ ;  $7.3 \pm 5.7\%$  y  $9.2 \pm 10.4\%$  respectivamente). La motilidad en el tratamiento 0%PS, fue similar a la observada por Morton et al (24) quienes obtuvieron  $8.6 \pm 1.8\%$  en espermatozoides epididimarios de alpaca en ausencia de PS después del descongelamiento. Sin embargo, diversos autores que utilizaron el mismo dilutor, para congelar espermatozoides epididimarios de alpaca, obtuvieron motilidades más altas al descongelamiento que las observadas en este estudio ( $52.7 \pm 5.7\%$  y  $24.1 \pm 6.5\%$  y  $24.07 \pm 6.5\%$ ) (11,22,25). Asimismo, respecto a los tratamientos con PS, se ha reportado que en espermatozoides epididimarios de alpaca que fueron incubados con 10% de plasma seminal, se obtuvo una motilidad de  $11.6 \pm 2.34\%$  (12); en espermatozoides de llama descongelados e incubados a  $37^\circ\text{C}$  con 0, 10 y 50% de plasma seminal, Fumuso (16) obtuvo motilidades de  $29.5 \pm 5.7\%$ ,  $28 \pm 12.3\%$  y  $19 \pm 12.7\%$ , siendo más altas que las reportadas en este estudio. Como es evidente, en espermatozoides epididimarios de alpaca incubados, la motilidad espermática disminuye a medida que transcurre el tiempo; en consecuencia, la diferencia en nuestros resultados podría deberse al extenso tiempo de procesamiento previo al congelamiento y la compleja metodología; incluso a pesar de haber tenido el cuidado necesarios en cuanto a temperatura e iluminación.

Los parámetros de viabilidad espermática estuvieron entre 12-16.5%, con un ligero pero gradual incremento de valores a medida que aumenta la concentración de PS, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas.

Los porcentajes de VE están muy por debajo de estudios previos que obtuvieron  $76.0 \pm 4.8\%$  y  $32.3 \pm 9.6\%$  en espermatozoides epididimarios de alpaca criopreservados (22,25); y similares a los obtenidos por Contreras et al (26), quien reportó 13.5% al descongelamiento. De igual forma, respecto a los parámetros de actividad mitocondrial en el presente estudio, estos fueron entre 20.9% y 16.9% de espermatozoides con alto PMM, ligeramente mayores a medida que disminuye la concentración de PS, sin ser estadísticamente distintos entre los grupos (Tabla 1); además, nuevamente son menores

a los valores obtenidos por Allauca et al (11) y mayores a los reportados por Contreras et al (26),  $34.97 \pm 9.96\%$  y  $13 \pm 3.1\%$  respectivamente, en espermatozoides epididimarios de alpaca criopreservados.

Aunque todos los grupos de investigación utilizaron animales de descarte durante temporadas similares de estudio, las diferencias en los resultados obtenidos respecto a la actividad mitocondrial, podrían deberse a la concentración del crioprotector empleada para la formulación del dilutor. En este sentido, podemos observar que Contreras et al (26) y este estudio utilizaron dimetilacetamida en molaridades de 0.89 M, 0.75 M y 0.5 M; respectivamente; mientras que, Allauca et al (11) utilizó el mismo crioprotector a una molaridad mayor (1M).

Por otro lado, en relación al parámetro espermático de apoptosis espermática, esta investigación es el primer estudio que reporta apoptosis en espermatozoides epididimarios de alpaca post congelamiento, analizados mediante citometría de flujo. Por otra parte, se le hicieron ligeras modificaciones al protocolo del fabricante a fin de depurar aquellas poblaciones de detritus que pudiesen enmascarar resultados. Se adicionó MDR al protocolo de AE, siendo que la detección de dicha sonda no se cruzaba con las demás.

Annexin V es una proteína de unión a fosfolípidos,  $Ca^{2+}$  dependiente, con afinidad por la fosfatidilserina de la membrana celular. Bajo condiciones normales, los fosfolípidos de la membrana están distribuidos asimétricamente, estando fosfatidilserina y fosfatidiletanolamida en la cara interna; y, la esfingomielina y fosfatidilcolina en la externa (27). Esta asimetría puede colapsar debido a eventos fisiológicos como el envejecimiento celular, activación de linfocitos o muerte celular programada (apoptosis) durante los cuales, la fosfatidilserina se transloca hacia la cara externa de la membrana para marcar la célula que será fagocitada por los macrófagos (28).

De esta forma, Annexin V en combinación con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es un marcador de actividad apoptótica, que al utilizarse con IP permiten diferenciar células viables de forma más específica. A diferencia de los protocolos que emplean sondas complementarias, como SYBR-14 y PI (29) para identificar células viables a partir de la integridad de su membrana plasmática; esta nueva combinación logra discriminar células realmente

viables, que no hayan activado sus mecanismos de apoptosis dentro de aquellas que mostraron membrana intacta (IP-).

Entonces, respecto a los resultados de AE, estos fueron 48.5, 51.7, 60.1 y 71.4% respectivamente; encontrando diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de 0%PS y 10%PS, en contraste con el tratamiento de 25%; y nuevamente distintas al tratamiento 50%PS. Como se observa, hubo un incremento gradual de AE a medida que se incrementa la concentración de PS, llegando a valores superiores de 70%, lo cual resulta importante si se desean emplear dichos resultados en programas de inseminación artificial. Cabe resaltar que el porcentaje de AE en la muestra incluye tanto la población de espermatozoides marcados vivos (PI-) como muertos (PI+). Es decir, la población que realmente estaría apta para ser utilizada en protocolos de inseminación artificial, sería alrededor de 8%.

Por otro lado, la proporción de espermatozoides necróticos (ANX- /PI+) es mayor en 0%PS; mientras que, la proporción de espermatozoides con necrosis temprana (ANX+ /PI+) aumenta a medida que aumenta la concentración de PS, lo cual permite inferir que podría existir un efecto protector del PS a nivel estructural que estaría evitando la fractura o ruptura de la membrana plasmática durante el congelamiento, a pesar de tener menor cantidad de crioprotector en el dilutor. Es decir, este efecto podría haber permitido que las membranas plasmáticas de las células permanecieran intactas por más tiempo, hasta activar sus propios mecanismos fisiológicos de muerte celular programada, en lugar de perder su integridad de inmediato (PI+) debido al congelamiento.

Esta teoría se sustenta principalmente en la molaridad del crioprotector utilizado en cada tratamiento; dado que, la concentración inicial del dilutor de base para el alicuotado y formulación de cada tratamiento fue de 0.99 M  $\approx$  1 M; sin embargo, no todos los tratamientos tuvieron dicha molaridad. La suplementación de PS sobre la suspensión de espermatozoides en dilutor (volumen/volumen), indirectamente causó que la molaridad del crioprotector disminuyera a medida que aumentaba la concentración de PS (Figura 1), lo cual pudo haber influido en los resultados obtenidos.

Con respecto a la peroxidación lipídica, es necesario recordar que BP es un fluorocromo

que marca células a partir de la oxidación de su estructura; es decir, cuando la sonda está inicialmente intacta tiene fluorescencia roja, que al ingresar a la célula y ser oxidada por ROS en el medio, modifica su estructura y fluoresce irreversiblemente a verde. Asimismo, al ser un análogo de ácidos grasos, difunde fácilmente a través de la bicapa lipídica y el riesgo de perderse con los lavados, es mínimo. Además, los lavados previos al uso de BP son imprescindibles para evitar que la sonda lipofílica se una a la yema de huevo del dilutor (30). En resumen, debido al mecanismo de acción de BP, el tiempo y la concentración de ROS son dos puntos importantes a tomar en cuenta.

Los niveles de PL estuvieron entre 72 y 76% con una ligera pero gradual disminución conforme se incrementa la concentración de PS, sin haber diferencia estadística significativa. Estos resultados son similares a los reportados por Evangelista et al (8), quien obtuvo 75% de espermatozoides reactivos a  $O_2^-$  y 79% de espermatozoides de alpaca reactivos a  $H_2O_2$  después del congelamiento. Por el contrario, Santiani et al (20) reportaron menos de 1% de PL en espermatozoides epididimarios epididimarios de alpaca frescos. Esto se debe a que durante el congelamiento se incrementa la producción de ROS (8) y esto a su vez provoca peroxidación de membranas y estrés oxidativo.

En la Figura 7 se observa que la proporción de los cuatro grupos de espermatozoides en cada tratamiento son similares, aun existiendo un déficit gradual de crioprotector, inverso a la concentración de PS (Figura 1). Asimismo, se sabe que el PS contiene antioxidantes que podrían contrarrestar el déficit intracelular de los mismos (4), en caso de estar frente a estrés oxidativo generado durante la criopreservación (8). Entonces, aunque los resultados respecto a PL en este estudio no son concluyentes, permite cuestionar si la presencia del PS en las muestras podría estar contrarrestando el efecto oxidativo de la deficiencia de crioprotector en cada tratamiento, para lo cual es necesario realizar más estudios.

Continuando con el análisis, se observa que la proporción de espermatozoides con alto PMM sin PL (Alto PMM /BP-) concuerda con los parámetros de AE (ANX+ /PI-), el mismo que determina que aproximadamente un 8% de la muestra sería

apta para técnicas de inseminación artificial (Figura 7 y Tabla 1). Asimismo, los eventos de PL en su mayoría se ubican dentro del grupo de espermatozoides de bajo PMM (Bajo PMM/ BP+). En efecto, la proporción de PL es mayor tanto en la población de espermatozoides con alto PMM como en la población de espermatozoides con bajo PMM (Figura 7). Sin embargo, este no es un resultado del todo negativo ya que, en principio, esta sonda no marca una sola estructura celular en cada célula; sino que, al ser un fluorocromo intrínsecamente lipofílico puede atravesar e ingresar en toda la extensión de la membrana espermática; al mismo tiempo, puede mostrarse reactiva en zonas cercanas a eventos de peroxidación y permanecer intacta en aquellas que no (Figura 6). Debido a ello, para la interpretación de este parámetro, recomendamos que debe ser de forma global, midiendo niveles de peroxidación, mas no cantidades de espermatozoides con peroxidación lipídica, vivos o muertos. En resumen, un espermatozoide que este experimentando PL, no necesariamente es un espermatozoides inviable o incapaz de fecundar, ya que los ROS son fisiológicamente necesarios en procesos asociados a la capacitación (31).

En conclusión, el presente estudio constituye una evidencia no concluyente de que la presencia del plasma seminal no afecta la viabilidad, la actividad mitocondrial, ni la peroxidación lipídica de los espermatozoides epididimarios de alpaca durante el proceso de criopreservación; sin embargo, en ausencia de este o cuando es agregado hasta en un 25% en el proceso de criopreservación, es posible obtener mejores resultados en cuanto a motilidad espermática y apoptosis espermática.

### **Conflicto de intereses**

Todos los investigadores declaran no tener ninguna clase de conflictos de interés en este trabajo de investigación.

### **Agradecimientos**

Esta investigación fue financiada por el Fondo para proyectos de tesis 2018 – 1 para pregrado de la Dirección general de investigación, desarrollo e innovación de la Universidad Científica del Sur, Lima – Perú.

## REFERENCIAS

1. Kershaw-Young C, Maxwell W. Seminal Plasma Components in Camelids and Comparisons with Other Species. *Reprod Domest Anim*. 2012; 47(SUPPL.4):369–375. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02100.x>
2. Zhang G, Yang W, Zou P, Jiang F, Zeng Y, Chen Q, et al. Mitochondrial functionality modifies human sperm acrosin activity, acrosome reaction capability and chromatin integrity. *Hum Reprod*. 2019; 34(1):3–11. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey335>
3. Durairajanayagam D, Singh D, Agarwal A, Henkel R. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia*. 2021; 53(1). <https://doi.org/10.1111/and.13666>
4. Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi A. Etiologies of sperm oxidative stress. *Int J Reprod Biomed*. 2016; 14(4):231–240. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4918773/>
5. Ghaleno L, Alizadeh A, Drevet J, Shahverdi A, Valojerdi M. Oxidation of sperm dna and male infertility. *Antioxidants*. 2021; 10(1):1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox10010097>
6. Aitken R, Baker M, Nixon B. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl*. 2015; 17(4):633–639. <https://www.ajandrology.com/text.asp?2015/17/4/633/153850>
7. Aitken R. Not every sperm is sacred; a perspective on male infertility. *Mol Hum Reprod*. 2018; 24(6):287–298. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay010>
8. Evangelista S, Trelles X, Muchotrigo D, Choez K, Santiani A. Producción intracelular de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica durante el proceso de criopreservación de semen de alpaca. *Spermova*. 2014; 4(1):61–63. [http://spermova.pe/site/files/revista2014n4v1/07\\_Evangelista-alapacas-61-63.pdf](http://spermova.pe/site/files/revista2014n4v1/07_Evangelista-alapacas-61-63.pdf)
9. Stuart C, Vaughan J, Kershaw-Young C, Wilkinson J, Bathgate R, de Graaf S. Effects of varying doses of  $\beta$ -nerve growth factor on the timing of ovulation, plasma progesterone concentration and corpus luteum size in female alpacas (*Vicugna pacos*). *Reprod Fertil Dev*. 2014; 27(8):1181. <https://doi.org/10.1071/RD14037>
10. Terreros M, Huanca W, Arriaga I, Ampuero A. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Rev Investig Vet del Perú*. 2015; 26(3):420–426. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11182>
11. Allauca P, Ugarelli A, Santiani A. Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas. *Rev Investig Vet del Perú*. 2019; 30(1):288–298. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15677>
12. Kershaw-Young C, Maxwell W. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology*. 2011; 76(7):1197–1206. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.016>
13. Aisen E, Huanca W, Pérez M, Torres E, Villanueva J, Ousset M, et al. Spermatozoa Obtained From Alpaca vas deferens. Effects of Seminal Plasma Added at Post-thawing. *Front Vet Sci*. 2021; 0:48. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.611301>
14. Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves MG, Neild DM, Miragaya MH, Gambarotta MC, et al. Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2018; 192:99–106. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.019>
15. Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves MG, Neild DM, Miragaya MH, Carretero MI. Evaluation of the cryoprotective effect of seminal plasma on llama (*Lama glama*) spermatozoa. *Andrologia*. 2019; 51(6):e13270. <https://doi.org/10.1111/and.13270>

16. Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves G, Neild DM, Miragaya MH, Bertuzzi ML, et al. Incubation of frozen-thawed llama sperm with seminal plasma. *Andrologia*. 2020; 52(6):e13597. <https://doi.org/10.1111/and.13597>
17. Bravo P, Alarcon V, Baca L, Cuba Y, Ordoñez C, Salinas J, et al. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Anim Reprod Sci*. 2013; 136(3):157–163. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.005>
18. Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, et al. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Investig Vet del Perú*. 2010; 21(2):145–153. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172010000200001&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172010000200001&lng=es)
19. Choez K, Ruiz L, Sandoval R, Evangelista S, Santiani A. Determinación de la concentración óptima de tres crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Rev Investig Vet del Perú*. 2017; 28(3):619–628. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13367>
20. Santiani A, Ugarelli A, Evangelista S. Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. *Anim Reprod Sci*. 2016; 173:49–55. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.010>
21. Mamani G, Moína M, Ramos M, Mendoza J, Ruiz J, Rivas V, et al. Effect of Extender and Freezing Rate on Quality Parameters and In Vitro Fertilization Capacity of Alpaca Spermatozoa Recovered from Cauda Epididymis. *Biopreserv Biobank*. 2019; 17(1):39–45. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0021>
22. Juárez J, Santiani A. Determinación del porcentaje de viabilidad espermática mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación en espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca. *Rev Investig Vet del Perú*. 2019; 30(3):1175–1183. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.16608>
23. Choez K, Evangelista S, Santiani A. Comparación de las características seminales de las alpacas huacaya y suri. *Spermova*. 2015; 5(1):139–143. <http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.31>
24. Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fertil Dev*. 2007; 19(7):792. <https://doi.org/10.1071/RD07049>
25. Canorio N, Paredes F, Valdivia M. Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Investig Vet del Perú*. 2015; 26(3):434–443. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11185>
26. Contreras W, García L, Santiani A. Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Investig Vet del Perú*. 2020; 31(1):e17548. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17548>
27. Gadella B, Visconti P. Regulation of capacitation. In: De Jonge C, Barratt C, editors. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press; 2006. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511545115.007>
28. Demchenko A. Beyond annexin V: Fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology*. 2013; 65(2):157–172. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9481-y>
29. Yániz J, Palacín I, Vicente S, Gosalvez J, López C, Santolaria P. Comparison of Membrane-Permeant Fluorescent Probes for Sperm Viability Assessment in the Ram. *Reprod Domest Anim*. 2013; 48(4):598–603. <https://doi.org/10.1111/rda.12132>
30. Ortega C, González L, Morrell J, Salazar C, Macías B, Rodríguez H, et al. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C 11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*. 2009; 138(1):55–63. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0484>
31. Aitken R. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev*. 2017; 84(10):1039–1052. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>